

Markery molekularne stosowane w diagnostyce raka piersi — obecna praktyka kliniczna i perspektywy rozwoju

Anna Walaszczyk¹, Dorota Gabryś²

¹Institute of Genetic Medicine, Newcastle University, Wielka Brytania

²Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Streszczenie

Rak piersi jest najczęstszą przyczyną zgonów spowodowanych przez nowotwory złośliwe u kobiet. W diagnostyce raka piersi wykorzystywanych jest wiele markerów molekularnych i genetycznych, do których należą m.in. CEA, CA15-3, MammaPrint®, HER2 oraz BRCA1, 2. Jednak heterogenność oraz mnogość podtypów raka piersi powoduje, że niezbędne jest znalezienie i wprowadzenie do praktyki klinicznej kolejnych markerów molekularnych umożliwiających wczesne wykrycie choroby oraz optymalizację i indywidualizację leczenia, między innymi poprzez ocenę ryzyka przerzutów. Hipotetyczny test diagnostyczny mógłby składać się z panelu wielu białek czy genów, które chociaż jako pojedyncze markery nie mają wystarczającej czułości i swoistości, to łącznie mają wysoki potencjał diagnostyczny i/lub rokowniczy. Takie nowe panele diagnostyczne zbudowane z różnych białek i peptydów poszukiwane są między innymi metodami proteomiki wykorzystującymi narzędzia spektrometrii mas. Kolejna grupa potencjalnych biomarkerów raka piersi to mikroRNA, których zmiana ekspresji prowadzić może do rozwoju guza i towarzyszyć procesowi przerzutowania. Kluczem do sukcesu okazać się może podejście systemowe, umożliwiające integrację danych genomicznych, proteomicznych i metabolomicznych.

Słowa kluczowe: rak piersi, biomarker, markery molekularne, diagnostyka, wczesna diagnoza

Przedrukowano za zgodą z: Biuletyn PTO NOWOTWORY 2018; 3, (5–6): 306–314

Artykuł jest tłumaczeniem pracy z: Walaszczyk A, Gabryś D. Molecular markers used in breast cancer diagnosis — current practice and future perspectives. NOWOTWORY J Oncol 2018; 68: 259–267.

Rak piersi — wprowadzenie

Rak piersi jest pierwszym pod względem częstości występowania nowotworem złośliwym u kobiet w Polsce i na świecie (ponad 1/5 wszystkich przypadków) oraz najczęstszą przyczyną zgonów spowodowanych przez nowotwory złośliwe u kobiet [1]. Zachorowalność na ten typ nowotworu wzrosła ponad dwukrotnie w ciągu ostatnich trzech dekad — w roku 2010 odnotowano około 16 000 nowych przypadków zachorowań [2]. Rak piersi jest nowotworem heterogennym związanym z wieloma czynnikami etiologicznymi [3]. Wśród czynników predysponujących do rozwoju tego typu raka są: płeć żeńska, wiek powyżej 50 lat, wczesna miesiączka i późna menopauza, a także szereg czynników środowiskowych i genetycznych [4].

Raki występujące w piersi dzielą się na dwa główne typy histologiczne: przedinwazyjny rak *in situ* oraz raki

naciekające (inwazyjne). Raki przedinwazyjne stanowią około 15% do 30% wszystkich zachorowań i dzieli się je na zrazikowe (LCIS — *lobular carcinoma in situ*), charakteryzujące się rozrostem gruczołów mlecznych, oraz przewodowe (DCIS — *ductal carcinoma in situ*), gdzie rozrost komórek nowotworowych dotyczy nabłonka gruczołu sutkowego, bez oznak naciekania podścieliska. Rak przewodowy *in situ*, prekursor raka inwazyjnego, jest heterogenny pod względem biologii oraz morfologii. W 80% przypadków raki te wykrywane są podczas badania mammograficznego (w postaci zwapnień), pozostałe 20% wykrywane są pod postacią torbielowatych guzów, choroby Pageta, zmian gwieździstych lub na podstawie wycieku z brodawki. Raki zrazikowe *in situ* charakteryzuje rozrost komórek nabłonka zrazików, który wypełnia całkowicie co najmniej 50% pęcherzyków, raki te nie tworzą guza oraz zwapnień, przez co są niewykrywane podczas mammografii.

Adres do korespondencji: dr n. med. Dorota Gabryś, Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44–101 Gliwice, e-mail: dorota.gabrys@io.gliwice.pl

Najczęściej występującym rakiem inwazyjnym jest rak przewodowy, który występuje w około 70–85% przypadków. Rak zrakowy powstały w gruczołach mlecznych stanowi około 15% spośród zachorowań. Oba rodzaje raka charakteryzują się podwyższonym ryzykiem wystąpienia przerzutów odległych. Rzadszymi rodzajami inwazyjnego raka piersi są raki: cewkowy/sitowate (6%), śluzowe (2%), rdzeniaste (2%), brodawkowate (1%) oraz metaplastyczne (< 1%). Ze względu na znaczące różnice w biologii raków inwazyjnych dodatkowo wprowadzono 3-stopniową ocenę złośliwości histologicznej. Wspólne cechy raków naciekających to: nacieki we wszystkich kierunkach, skórka pomarańczowa, zaciąganie brodawki, przerzuty do płuc, kości, wątroby, nadnerczy oraz mózgu. Przerzuty do węzłów chłonnych to najważniejszy czynnik prognostyczny. W przypadku braku przerzutów odległych szacuje się, że szanse na przeżycie 10 lat sięgają 80%, natomiast zajęcie jednego do 3 węzłów chłonnych obniża szansę na 10-letnie przeżycie do 35–40%.

Markery molekularne wykorzystywane obecnie w diagnostyce raka piersi

Markerem molekularnym może być m.in. gen, transkrypt lub białko (czy zestawy takich cząsteczek), którego stan oraz ilość związana jest z ryzykiem, występowaniem lub stopniem zaawansowania choroby. Markery nowotworowe pod kątem pochodzenia można podzielić na dwa typy. Pierwszy to markery produkowane przez komórki nowotworu i są to antygeny swoiste nowotworów, czyli TSA (*tumor specific antigens*). Drugi typ markerów nowotworowych to antygeny towarzyszące nowotworom produkowane przez komórki prawidłowe w wyniku ich odpowiedzi na patologiczne zmiany w środowisku, określane również jako TAA (*tumor associated antigens*) [5]. Markerami mogą być kwasy nukleinowe, białka, lipidy i inne metabolity, ale również całe komórki guza, które można znaleźć we krwi (CTC – *circulating tumor cells*) [6]. Markery molekularne, w tym markery nowotworowe, mogą być wykrywane we krwi, moczu bądź w wycinkach tkanek pacjenta. W zależności od sposobu pobrania materiału do oznaczeń markery można podzielić na inwazyjne oraz nieinwazyjne [7]. Markery inwazyjne charakteryzuje konieczność ingerencji chirurgicznej w celu pobrania materiału do badań. W grupie tej znajdują się markery oznaczane technikami immunohistochemicznymi, takie jak ER, PR, HER2, Ki-67, p53, których analiza wymaga przeprowadzenia biopsji lub pobrania fragmentu tkanki podczas operacji. Zaletą tego typu markerów jest ich duża specyficzność, przez co są powszechnie stosowane do dokładnej diagnostyki oraz prognozowania przebiegu choroby. Markery nieinwazyjne to białka, enzymy, hormony czy krążące komórki guza obecne w płynach ustrojowych takich jak surowica, osocze, wydzielina brodawki sutkowej,

łzy, moczu oraz ślina [8]. Pobranie materiału do badań nie jest uciążliwe i obciążające pacjenta, aczkolwiek markery oceniane są w materiale nienowotworowym, co powoduje, że parametry takie jak czułość oraz specyficzność są dyskusyjne. Do oznaczeń tych markerów stosuje się m.in. metody immunologiczne, techniki spektrometrii mas, cytometrii przepływowej [9] oraz qRT-PCR [10]. W analizie markerów molekularnych najistotniejszymi parametrami są czułość i specyficzność oraz ich wartość predykcyjna. Czułość markera odzwierciedla liczbę poprawnie zidentyfikowanych próbek od osób chorych i jest obliczana jako stosunek wyników prawidłowo dodatnich względem sumy wyników prawidłowo dodatnich i fałszywie ujemnych (wartość wyrażona w procentach). Swoistość markera odzwierciedla liczbę osób zdrowych błędnie zaklasyfikowanych do grupy chorych i jest obliczana jako stosunek wyników prawdziwie ujemnych i sumy wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych. Idealny marker powinien charakteryzować się 100-procentową czułością i swoistością. Pozytywna wartość predykcyjna (PPV) oznacza wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia choroby przy wykryciu markera i jest obliczana jako stosunek liczby wyników prawidłowo dodatnich do sumy wyników prawidłowo i fałszywie dodatnich. Analogicznie negatywna wartość predykcyjna (NPV) wskazuje na niskie prawdopodobieństwo obecności choroby w przypadku braku wykrytego markera. Poniżej scharakteryzowane są markery obecnie wykorzystywane w praktyce klinicznej w diagnostyce raka piersi.

Status receptorów hormonalnych

Status hormonalny pacjentki ma znaczenie zarówno w etiologii choroby, jak i w odpowiedzi na leczenie, dlatego wybór leczenia uzależniony jest od ekspresji poszczególnych receptorów. Ekspresję receptora estrogenowego (ER) stwierdza się w 70% raków piersi. Posiada on dwie izoformy: α i β , w praktyce klinicznej oznacza się głównie ekspresję ER α . Obecność formy β w guzie jest wiązana z lepszymi prognozami i dłuższym okresem wolnym od choroby [11]. Pacjentki ze statusem ER+ mają znacząco lepszą odpowiedź na leczenie antyestrogenowe (np. tamofen) niż pacjentki ER- [12], jednak w pracy Gua i wsp. wykazano, że wysokie stężenia ER β u pacjentek – niezależnie od terapii – jest czynnikiem niekorzystnym, natomiast niskie stężenia ER β u pacjentek leczonych hormonalnie skorelowane były z wydłużeniem czasu życia wolnego od choroby w odniesieniu do grupy bez leczenia hormonalnego [13]. Estrogeny, poprzez wiązanie się ze swoimi receptorami, indukują syntezę receptora progesteronowego [14]. Badania kliniczne wykazały, że pacjentki zaklasyfikowane jako ER-/PR- charakteryzuje większa śmiertelność od pacjentek ER-/PR+, co związane było z lepszą odpowiedzią na terapię hormonalną w tej drugiej grupie [15]. Ekspresja receptorów ER i PR nie jest stała i ulega zmianie wraz z postępem choroby [16].

Status receptorów HER2

Do istotnych czynników prognostycznych w raku piersi należy status receptora HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*). HER2 to glikoproteina pełniąca funkcję receptora błonowego, należąca do rodziny receptorów dla naskórkowych czynników wzrostu. Protoonkogen HER2/neu/erbB-2 jest wykrywany w formie wielokrotnie u 10–35% chorych na raka piersi, co jest ważnym niekorzystnym czynnikiem prognostycznym zarówno we wczesnym, jak i zaawansowanym raku piersi [17]. Pierwszy raz nadekspresję tego receptora potwierdzono u chorych na raka piersi przez grupę Van de Vijvera w roku 1988. W tym samym roku grupa Bergera wykazała zależność pomiędzy nadekspresją receptorów HER2 a statusem węzłów chłonnych (N) i rozmiarem guza [18, 19]. W kolejnych latach wykazano, że nadekspresja tego receptora związana jest z bardziej agresywnym fenotypem raka i gorszymi prognozami [20]. Podstawowym badaniem do oceny statusu receptora HER2 jest badanie immunohistochemiczne, którego uzupełnieniem jest badanie amplifikacji genu techniką FISH (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*), zalecane każdorazowo w przypadku, gdy wynik oznaczania ekspresji białka jest niejednoznaczny. Przeciwciała skierowane przeciw zewnątrzkomórkowej domenie receptora HER2 to trastuzumab. Przeciwciała to wykorzystywane jest w leczeniu adiuwantowym pacjentek HER2, redukując ryzyko nawrotu choroby, jak również obniżając śmiertelność w grupie pacjentek chorych na raka we wczesnym stadium [21]. Wykazano, że nadekspresja HER2 związana jest ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia przerzutów do mózgowia u osób z zaawansowanym rakiem [21, 22]. Ponadto ilościowe pomiary HER2, poziomu białka HER3 i p95HER2 pozwalają na dogłębną analizę ich potencjalnej wartości prognostycznej. Taka ocena wykazała między innymi, że zależność pomiędzy ekspresją HER2 a przeżyciem całkowitym pacjentek otrzymujących lapatinib po progresji na trastuzumabie przyjmuje kształt litery U z najlepszą odpowiedzią wśród pacjentek ze średnią nadekspresją HER2 i wysoką ekspresją p95HER2 [23]. Co więcej, ilościowa ocena ekspresji p95HER2 i HER2 może być przydatna w ocenie ryzyka występowania przerzutów do mózgowia, co wymaga dalszych badań [24].

Podtypy molekularne oceniane na podstawie ekspresji genów

Na podstawie cech profilu ekspresji genów w tkance guza można wyodrębnić cztery podtypy raka piersi [25, 26]: typ luminalny A, luminalny B, typ podstawnokomórkowy oraz HER2- dodatni, nazywany również nieluminalnym. Typ luminalny A charakteryzuje się wysoką ekspresją genów związanych z czynnością receptorów estrogenowych i zarazem niewielką ekspresją genów związanych z proliferacją oraz genów związanych z ekspresją receptora HER2. Typ luminalny B charakteryzuje pozytywny status ER połączony

z niską ekspresją genów związanych z tym receptorem oraz wyższą niż w typie A ekspresją genów związanych z proliferacją ocenianą poprzez oznaczenie Ki-67. Zespół panelistów z St. Gallen uznał stopień złośliwości oraz ekspresję Ki-67 za czynniki, które mogą być użyte do różniczenia między guzami typu luminalnego A i podtypu B. Ma to istotne znaczenie w ocenie rokowniczej, która jest lepsza w typie A [27]. Trzeci typ to rak typu podstawnego (*basal-like breast carcinoma*), zwany również rakiem potrójnie ujemnym (*triple negative*) ze względu na nieobecność receptorów estrogenowych i progesteronowych oraz brak ekspresji receptora HER2 – w konsekwencji nie stwierdza się tu ekspresji genów związanych z tymi receptorami. Grupa pacjentek z takim rodzajem nowotworu z przerzutami do mózgowia jest szczególnie interesująca, w ich przypadku wykorzystanie biologicznych markerów (CK 5/6, HER1, c-KIT) może pomóc w zróznicowaniu podtypu podstawnego podobnego i niepodobnego, niemniej jednak ich kliniczna przydatność jest niejednoznaczna [28]. Ostatni podtyp molekularny raka piersi charakteryzuje nadekspresja HER2 połączona z nieobecnością ER i PR [22].

Molekularny podtyp raka piersi można ocenić, wykonując jeden z kilku dostępnych testów genomicznych. Test Oncotype DX® pozwala na określenie ekspresji panelu 21 genów, pozwalając oszacować indywidualne ryzyko nawrotu raka u pacjentek zdiagnozowanych we wczesnym stadium raka piersi. Test ten pozwala również zindywidualizować terapię ze względu na informację o korzyściach wynikających z chemioterapii. Ocena ryzyka nawrotów oparta na wyniku 21-genowego testu raka piersi przewiduje korzyści z chemioterapii, jeśli jest wysoki, natomiast niskie ryzyko nawrotów przy braku chemioterapii, jeśli jest niski. Ponadto uzupełniająca terapia hormonalna i chemioterapia połączona z terapią hormonalną wykazywały podobną skuteczność u kobiet z hormonalnie pozytywnym, HER2-negatywnym, NO rakiem piersi, które uzyskały pośredni wynik testu, chociaż odnotowano korzyści z chemioterapii u niektórych kobiet w wieku 50 lat i młodszych [29, 30].

Kolejnym wielogenowym testem diagnostycznym jest MammaPrint®. Test ten opiera się na analizie sygnatur 70 genów. Jest on wykorzystywany przez klinicystów do wyboru terapii minimalizującej ryzyko nawrotu choroby. W teście Breast Cancer Index przeprowadzane są analizy ekspresji genów związanych z dwoma typami ścieżek sygnałowych – związanych z estrogenami oraz proliferacją komórek; możliwe jest oszacowanie zysków wynikających z terapii endokrynnej, jak również ryzyko wznowy [31]. Ponadto ostatnie wyniki badania randomizowanego EORTC 10041/BIG 3-04 MINDACT wykazały przydatność oceny molekularnej (Blueprint i MammaPrint®) podtypu raka piersi w porównaniu do oceny immunohistochemicznej. Na podstawie oceny molekularnej 54% pacjentek z podtypem luminalnym B mogło być zakwalifikowanych do podtypu luminalnego A z podobnymi wynikami leczenia.

W związku z tym klasyfikacja molekularna może pomóc w identyfikacji większej grupy pacjentek z niskim ryzykiem nawrotu choroby w porównaniu z bardziej współczesną metodologią klasyfikacji, w tym wysokiej jakości ocenianą metodą Ki-67 [32].

Panele wielogenowe są lepsze od tradycyjnych czynników prognostycznych w przewidywaniu odpowiedzi klinicznej i identyfikacji pacjentek, którym można oszczędzić podanie chemioterapii. Dostępne dowody potwierdzają kliniczną walidację paneli wielogenowych, z których Oncotype DX® i MammaPrint® mają najsilniejsze dowody wspierające ich kliniczną użyteczność i skuteczność decyzji w luminalnym raku piersi [33, 34].

PAM-50 to test oparty na metodzie qPCR. Umożliwia on analizę ekspresji 50 genów na bazie materiału biopsyjnego oraz klasyfikację raków na podtypy i przewiduje ryzyko nawrotu (ROR) po 10 latach. Dodatkowe włączenie znanych kliniczno-patologicznych czynników znacznie zwiększa jego predykcję [25, 35, 36]. Wynik testu PAM-50 może pomóc w określeniu grupy pacjentek, które mogą czerpać większe korzyści z dodatkowego zastosowania taksanów w leczeniu uzupełniającym [37]. Dalsze badania kliniczne powinny oceniać zdolności testu PAM-50 i innych badań genowych do podziału pacjentów i indywidualizacji leczenia w zależności od oczekiwanego ryzyka wznowy i wystąpienia przerzutów, tym bardziej że wiele problemów pozostaje do rozwiązania, zanim panele wielogenowe będą miały większy wpływ na leczenie raka piersi, na przykład dokładne przewidywanie późnego nawrotu w ER-dodatnim raku piersi czy zapewnienie większego dostępu do paneli wielogenowych [34].

Profil genetyczny pacjentki

Do najważniejszych czynników genetycznych, które determinują predyspozycje do raka piersi, należą geny *BRCA1* i *BRCA2*. Geny te zaklasyfikowane są jako tzw. geny supresorowe, a ich produkty białkowe biorą udział między innymi w regulacji transkrypcji, naprawie uszkodzonego DNA oraz w procesie różnicowania. Mutacje germinalne w obrębie genów *BRCA* związane są ze wzrostem ryzyka zachorowania (do 70% w odniesieniu do osób nieobciążonych mutacjami). Częstość występowania różnych typów mutacji w obrębie tych genów jest zależna od grupy etnicznej i regionu geograficznego [38, 39]. Ocena występowania mutacji w genach *BRCA* ma znaczenie nie tylko jako czynnik ryzyka powstawania nowotworu, ale odgrywa istotną rolę w wyborze leczenia systemowego. Wykazano, że w zaawansowanym raku piersi pacjentki będące nosicielkami mutacji odnoszą większe korzyści z zastosowania carboplatyny w porównaniu do docetakselu [40]. Poza mutacjami w obrębie genów *BRCA* również inne zmiany genetyczne związane są z podwyższonym ryzykiem raka piersi. Do genów tych należą: *TP53* (u chorych na syndrom Li-Fraumeniego), *STK11* (u chorych na syndrom Peutza-

-Jeghersa) oraz *PTEN*. Ponadto wśród badanych rodzin, których członkowie chorują na raka piersi, wykazano również obecność mutacji w genach takich jak *CHEK2*, *ATM*, *PALB2* oraz *BRIP1* [41].

Potencjał proliferacyjny

Białkiem umożliwiającym ocenę tempa proliferacji w tkance nowotworowej jest białko Ki-67. Pacjentki, u których w ponad połowie komórek guza stwierdzono ekspresję tego czynnika, są w grupie wysokiego ryzyka nawrotu choroby. Wysoka ekspresja tego czynnika związana jest z gorszymi rokowaniami, ale z lepszą odpowiedzią na chemioterapię [42, 43]. Ekspresja białka Ki-67 może być niezależnym czynnikiem prognostycznym określającym okres wolny od choroby, wymaga to jednak standaryzacji oceny parametru [44]. Znaczącym czynnikiem w ocenie ekspresji Ki-67 jest prawidłowo wykonane badanie przez wykwalifikowanych specjalistów. Chociaż dane dotyczące ustandaryzowania punktacji są zachęcające, to nadal istnieją rozbieżności pomiędzy zakładami patomorfologii. Ponadto informacja o ekspresji Ki-67 ma znaczący wpływ na podejmowanie decyzji o zastosowaniu leczenia systemowego. W przypadku wysokiej ekspresji Ki-67 chemioterapia może być brana pod uwagę nawet przy rozpoznaniu wczesnego raka piersi i przy ER dodatnich guzach [27].

Markery nowotworowe wykrywane są też w surowicy lub osoczu krwi. Najczęściej wykorzystywanymi markerami nowotworowymi są glikoproteiny obecne w błonie zrakowanych komórek nabłonkowych. Należą tu między innymi mucyny takie jak CA15-3 (*cancer antigen 15-3*), który jest produktem genu *MUC1*. Do tej grupy markerów należą również: PEM, MCA, MSA oraz CA125 (*cancer antigen 125*). Ich poziom może być podwyższony w przebiegu kilku typów nowotworu (poza rakiem piersi są to rak jajnika, rak endometrium, rak jajowodu czy rak płuc). Innym markerem nowotworowym stosowanym w diagnostyce wielu typów nowotworów, w tym raka piersi (szczególnie w rakach przewodowych), jest CEA (*carcinoembryonic antigen*), będąca glikoproteiną surowicy krwi [45]. CEA wraz z CA15-3 uznawane są za marker służący do monitorowania nawrotu choroby. CA15-3 ulega nadekspresji w 90% przypadków raka piersi, nie jest to jednak (podobnie jak CEA) marker swoisty dla tego rodzaju nowotworu. Stężenie tych markerów przyrasta wraz z wielkością guza, a wzrost ich stężenia zaobserwowano także w zapaleniach wątroby, łagodnych zmianach piersi i jajnika, w raku macicy, jajnika czy płuc. CA15-3 charakteryzuje niewielką czułość diagnostyczną w pierwszych stadiach choroby (I, II), waha się ona bowiem między 20 a 30%, z tego też powodu nie nadaje się do badań przesiewowych, ale marker ten jest wykorzystywany w diagnostyce przerzutów [46]. W zaawansowanych stadiach choroby (stadium III i IV) czułość CA15-3 wzrasta do 70%. Synteza CEA ulega nasileniu w komórkach raka piersi,

jak również w komórkach wywodzących się z raka jelita grubego, trzustki, żołądka. Z tego też powodu CEA cechuje ograniczona czułość i swoistość diagnostyczna. Podobnie jak CA15-3 marker ten nie nadaje się do badań przesiewowych, jednakże jest wykorzystywany do wykrywania wznowy oraz przerzutów odległych. Dodatnia wartość predykcyjna wzrostu stężenia CEA dla potwierdzenia progresji wynosi ponad 90%, jest on więc uznawany za uniwersalny marker przerzutów nowotworowych [47].

Kolejną grupę markerów stosowanych w diagnostyce raka piersi stanowią cytokeratyny, będące nierozpuszczalnymi białkami strukturalnymi komórek nabłonkowych, których obecność we krwi świadczy o postępujących w tkankach procesach śmierci komórkowej. Fragmenty cytokeratyn 8, 18 i 19 obecne w surowicy krwi są potencjalnymi markerami dla diagnostyki wczesnych stadiów raka piersi [48, 49]. TPA (*tissue polypeptide-specific antigen*) to kompleks peptydowy związany z cytokeratyną 18. Marker ten związany jest ze zdolnościami proliferacyjnymi komórek guza, obecność tego kompleksu we krwi jest czynnikiem niekorzystnym, wskazuje bowiem na szybki nawrót choroby [50, 51].

Nowe czynniki molekularne o potencjalnym zastosowaniu w diagnostyce raka piersi

Dotychczas wykorzystywane „klasyczne” biomarkery raka piersi nie znajdują zastosowania w badaniach przesiewowych. Podstawową przyczyną są ich niewielkie stężenia w rakach niezaawansowanych (*in situ*) oraz niska czułość i specyficzność we wczesnych stadiach choroby [52]. Markery te służą więc zazwyczaj do monitorowania ewentualnego nawrotu choroby podczas leczenia, jak również po jego zakończeniu [53]. Ponadto nie ma żadnych doniesień o możliwości zastosowania tych markerów w ocenie ryzyka przerzutów u chorych z nisko zaawansowanym rakiem piersi, które są główną przyczyną niepowodzenia leczenia w tej grupie pacjentek. Z tego też powodu trwają intensywne badania mające na celu identyfikację markerów o potencjalnym zastosowaniu we wczesnej diagnostyce oraz ocenie ryzyka przerzutów, szczególnie u pacjentek z wcześniej wykrytym nowotworem. Poniżej przedstawionych jest kilka grup potencjalnych biomarkerów testowanych w tym kontekście.

Metaloproteinazy

Wśród nowych markerów nowotworowych, badanych również pod kątem ich przydatności w diagnostyce nowotworów piersi, są metaloproteinazy, które jako enzymy proteolityczne umożliwiają trawienie komponentów macierzy pozakomórkowej oraz licznych molekuł na powierzchni komórek, a tym samym uczestniczą w procesach tworzenia przerzutów oraz angiogenezie. Do metaloproteinaz o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym należy MMP-9. Uważa się, że stosunek stężeń MMP-9/TIMP-1 (swoistego

inhibitora MMP-9) może mieć charakter prognostyczny w raku piersi [54].

Białka jądrowe związane z aktywnością proliferacyjną

PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) to białko jądrowe, niehistonowe, które bierze udział zarówno w syntezie DNA, jak i w odpowiedzi na uszkodzenie materiału genetycznego. W praktyce klinicznej traktowane jest jako marker aktywności mitotycznej, podobnie jak Ki-67 u pacjentek chorych na raka piersi. Fosforylacja tego białka w pozycji tyrozyny 211 jest pozytywnie skorelowana ze wzrostem proliferacji komórek nowotworowych, a tym samym jest ona czynnikiem niekorzystnym rokowniczo [55, 56].

Chemokiny i ich receptory błonowe

Receptor chemokinowy CCR2 to białko błonowe, specyficznie wiążące się z chemokinami CCL2. Chemokiny te wydzielane są przez monocyty oraz makrofagi. Wykazano nadekspresję tej chemokiny wraz z jej receptorem w rakach piersi z przerzutami do płuc oraz kości [57, 58]. Ponadto CCL2 koreluje ze stopniem zaawansowania guza i jest czynnikiem prognostycznym dla oszacowania czasu wolnego od przerzutów/wznowy w raku piersi [58]. CCL2 wraz z chemokiną CCL5 w warunkach prawidłowych stymulują migrację monocytów i komórek T do miejsc uszkodzonych lub zainfekowanych. Chemokiny te wykazują wyższą ekspresję w tkankach guza niż w tkankach prawidłowych, a CCL5 jest chemokiną charakterystyczną dla pacjentek z potrójnie ujemnym podtypem molekularnym [58–60]. CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*) to transbłonowy receptor białkowy odpowiedzialny za migracje komórek z guza pierwotnego do płuc, kości oraz węzłów chłonnych. Mechanizm jego działania polega na chemotaksji, gdyż organy te wydzielają chemokinę CXCL12, będącą ligandem tego receptora. U pacjentek z potrójnie ujemnym typem raka piersi wysoka ekspresja tego receptora może wskazywać na agresywniejszy fenotyp guza niż u pacjentek z niskim poziomem CXCR4 [61].

Białka błonowe

Integralne białka błony komórkowej tworzące wpuklenia błony (tzw. kaweole) to kaweoliny, które biorą udział w przekazywaniu sygnałów komórkowych oraz w transporcie pęcherzykowym. Ekspresja kaweolin CAV1 i CAV2 jest często powiązana z rakami potrójnie ujemnymi i wysokim stopniem histologicznym zaawansowania choroby [62]. Kaweolina 1 (CAV1) może być markerem stresu oksydacyjnego, a jej poziom wydaje się być związany z odpowiedzią na chemio- i radioterapię [63].

Białka związane z mikrotubulami

Jedną z metod leczenia raka piersi jest podawanie leków oddziałujących na strukturę mikrotubul. Rozpad lub

stabilizacja tych struktur komórkowych zmniejsza proliferację komórek. Jednym z białek związanych z mikrotubulami jest białko ATIP3, które wydłuża czas podziału komórki, tym samym zmniejszając liczbą podziałów komórkowych. Wśród pacjentek chorych na inwazyjnego raka piersi oraz u pacjentek z przerzutami wykazano znamienne obniżony poziom białka ATIP3 oraz genu go kodującego (*MTUS1*) o odpowiednio 74, 7% i 62, 4% w grupie pacjentek z przerzutami. Dane te wskazują na białko ATIP3 jako cel terapeutyczny oraz jako potencjalny biomarker dla powstawania przerzutów [64, 65].

Czynniki transkrypcyjne

GATA4 to czynnik transkrypcyjny, który pełni ważną rolę w progresji nowotworu (ekspresja genów regulowanych tym czynnikiem jest skorelowana z przerzutami oraz statusem HER2). Jest to marker szczególnie przydatny dla pacjentek z inwazyjnym rakiem przewodowym i dla tej grupy chorych może być czynnikiem prognostycznym [66]. Czynniki transkrypcyjne HIF2 α aktywuje m.in. ekspresję genu kodującego metaloproteinazę MMP-9. W badaniach immunohistochemicznych bazujących na materiale od pacjentek chorych na nowotwory piersi wykazano ekspresję tych białek w odpowiednio 60% i 66% preparatów. Zarówno ekspresja HIF2 α , jak i MMP koreluje ze stopniem zaawansowania raka piersi, a wysoka ekspresja białka HIF2 α koreluje z krótkim czasem przeżycia [67].

Czynniki wzrostu

Czynniki wzrostu takie jak EGF, HGF, IGF, VEGF oraz TGF- β są badane zarówno pod kątem ryzyka wystąpienia nowotworu, ale również jego progresji. TGF- β jako biomarker jest użyteczny jako prognostyczna informacja dla pacjentek chorych na raka piersi w stadium I do III. Uważa się, że podwyższony poziom TGF- β może charakteryzować pacjentki, u których występuje ryzyko nawrotu choroby [68].

Panele białek wykrywane metodami proteomicznymi

Badania proteomiczne umożliwiają poznanie pełnego zestawu białek obecnych w danej tkance, ich strukturę, modyfikację oraz wzajemne relacje. Informacje na temat składu jakościowego oraz ilościowego białek komórkowych mogą być generowane wieloma technikami (przede wszystkim z wykorzystaniem spektrometrii mas), a dla finalnego wyniku takich badań kluczowa jest prawidłowa bioinformatyczna obróbka danych oraz integracja danych pochodzących z różnych dziedzin. Proteomika kliniczna umożliwia poznanie zmian zachodzących w tkankach i płynach ustrojowych w czasie rozwoju choroby oraz w trakcie terapii [69, 70]. Metody proteomiki wykorzystywane są również do „nienadzorowanego” poszukiwania białek o potencjalnym znaczeniu dla diagnostyki raka piersi. Tabela I przedstawia skrócone omówienie szeregu badań, których

celem było wykrycie, zarówno w tkance guza, jak i w płynach ustrojowych, potencjalnych biomarkerów raka piersi. Należy zwrócić uwagę, że wśród potencjalnych markerów raka piersi wykrywanych metodami proteomiki w surowicy i osoczu krwi dominują białka związane ze stanami zapalnymi. Szacuje się, że podwyższona obecność amyloidu (SAA) oraz białka S100A4 zwiększa ryzyko wystąpienia przerzutów [71–73]. Ponadto ryzyko wystąpienia raka piersi wydaje się być skorelowane z poziomem i modyfikacjami apolipoprotein [74, 75].

Krające komórki guza

Obecność we krwi krążących komórek guza (CTC, *circulating tumor cells*) jest ważnym czynnikiem diagnostycznym i rokowniczym w wielu typach nowotworów [84]. Uważa się, że poziom CTC może być użytecznym markerem prognostycznym we wczesnych stadiach raka piersi oraz może korelować z poziomem inwazyjności i agresywności guza [85]. CTC można również wykorzystywać jako materiał do badań innych biomarkerów. Stwierdzono, że białko TFF1 obecne w CTC u chorych na raka piersi silnie koreluje z wystąpieniem przerzutów do kości [86]. Ponadto pacjentki z wysoką ekspresją ER β w krążących komórkach guza wykazywały dobrą odpowiedź na leczenie hormonalne [87].

MikroRNA

W ostatniej dekadzie prowadzi się intensywne badania nad MikroRNA pod kątem jego użyteczności diagnostycznej i rokowniczej. MikroRNA to krótkie (21–24 nukleotydy), niekodujące cząsteczki RNA, które zazwyczaj wiążą się do regionów 3'UTR obecnych w transkryptach mRNA i regulują poziom ekspresji wielu genów. Cząstki miRNA można oznaczyć zarówno w tkance, jak i w płynach ustrojowych. Prawdopodobnie miRNA związane z nowotworem dostają się do krwioobiegu, kiedy komórki guza umierają. Inną możliwością jest aktywne wydzielanie miRNA poprzez egzozomy [88]. W pracy Wu i współautorów [89] u pacjentek chorych na raka piersi wykryto ponad 800 różnych miRNA. Dwa spośród nich, mi-R357 oraz mir-122, wykazywały silną korelację z wynikiem leczenia, a tym samym z wyborem leczenia. Analizując próbki od pacjentek, grupa ta wykazała, że ekspresja mir-497 negatywnie koreluje ze stadiem zaawansowania, z przerzutami do węzłów chłonnych i wielkością guza. Nie wykazano natomiast korelacji z klasycznymi markerami takimi jak status ER, PR czy p53. Z kolei grupa Huang wykazała, zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, że cząsteczki mir-373 i mir-520c stymulują migrację komórek rakowych i ich inwazyjność [90–92]. Utrata supresorowych miRNA takich jak: miR-206, miR-17-5p, miR-205, miR-125b, miR-200, miR-34a, miR-27b, miR-126, miR-101, miR-145, miR-205 i miR-31 i/lub nadekspresja onkogenów miRNA (miR-21, miR-155, miR-10b, miR-373, miR-520c, miR-27a, miR-221/222) były obserwowane u pacjentek chorych na raka piersi [93]. W 2012 grupa Schraudera

Tabela I. Potencjalne biomarkery raka piersi zidentyfikowane różnymi metodami proteomiki

Potencjalny biomarker	Wykorzystana metoda	Materiał wykorzystany do badań	Literatura
CBP1, PDZ, LIM, PDLIM2, RNF25	iTRAQ-2D LC MS/MS immunohistochemia	24 próby z węzłów chłonnych zajętych nowotworem 24 próby z węzłów chłonnych niezajętych nowotworem 48 prób pobranych z guzów pacjentek	Bouchal i wsp. [76]
TCEAL4, AZGP1, S100A10, CAPS ALDH6A1, AHNAK, FBP1, S100A4, MX1, HSP90AB1, PDXK, GFPT1, RAB21,	iTRAQ	12 prób pobranych z guza od pacjentek ze wznową 12 prób z guza pobranych od pacjentek bez objawów choroby > 7 lat	Johansson i wsp. [77]
ECM1, MAST4, Filagryny	Label-Free LCMS/MS	20 prób moczu pobranych od pacjentek chorych na raka piersi 20 próbek moczu pobranych od kobiet zdrowych	Beretov i wsp. [78]
15SFAA	UPLC-MS	27 próbek śliny od kobiet chorych na raka piersi 28 próbek śliny od kobiet zdrowych	Cheng i wsp. [79]
Apolipoproteina C1, Anhidraza węglanowa 1, L1CAM	MRM-MS	80 prób osocza pobranego od pacjentek chorych na raka piersi 80 prób osocza pobranego od zdrowych kobiet	Lee i wsp. [80]
Apolipoproteina AI, POTE, HPX	Label-Free LCMS/MS	20 próbek tkanek pobranych od pacjentek chorych na raka piersi	Cine i wsp. [81]
Apolipoproteina H, ApoCL, Apolipoproteina AI, C3a, TTR	SELDI-TOF MS Western-blott MALDI-TOF/TOF MS	99 próbek krwi pacjentek chorych na raka piersi 51 próbek krwi od kobiet zdrowych	Chung i wsp. [70]
Peptyd PTHpodobny	SELDI-TOF MS	111 prób osocza pobranego od pacjentek chorych na raka piersi	Washam i wsp. [82]
Serum amyloid, Haptoglobina	ELISA	118 próbek krwi pacjentek chorych na raka piersi 51 próbek krwi od kobiet zdrowych	Zhang i wsp. [83]

przeprowadziła analizy mikromacierzowe miRNA we krwi obwodowej 48 pacjentek we wczesnych stadiach zaawansowania choroby oraz 57 osobach zdrowych. Wykryto 59 cząstek miRNA różnicujących te dwie grupy kobiet, z czego 13 charakteryzowała nadekspresja, a 46 obniżenie względem grupy kontrolnej [94]. Doniesienia te wskazują na ogromny potencjał informacyjny, jaki niosą ze sobą badania nad miRNA, zarówno jako czynników regulujących wiele procesów w komórce, jak i przede wszystkim ich potencjału diagnostycznego oraz prognostycznego.

Podsumowanie

Z powodu niezadowolającej wyleczalności raka piersi konieczne jest opracowanie nowych testów diagnostycznych w celu wczesnego wykrycia choroby. Poszukiwany jest również panel biomarkerów prognostycznych i predykcyjnych,

pozwalający na indywidualizację sposobu leczenia chorych. Spersonalizowana medycyna zakłada systemowe podejście do choroby. Kluczem do sukcesu okazać się może integracja danych molekularnych: genomicznych, proteomicznych oraz metabolomicznych wraz z parametrami klinicznymi.

Podziękowania

Praca została sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki, grant numer: UMO- 2012/05/N/-/NZ4/02307, wykorzystano infrastrukturę informatyczną zakupioną w ramach projektu grantowego: POIG.02.03.00-14-084/13 (ONKO.SYS). Autorzy pragną podziękować Monice Pietrowskiej za cenne uwagi i pomoc przy tworzeniu manuskryptu.

Konflikt interesów: nie zgłoszono

Piśmiennictwo

1. World Health Organization. GLOBOCAN 2012 Estimated cancer incidence. Mortality and prevalence worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
2. Krajowy Rejestr Nowotworów. <http://onkologia.org.pl/nawotwory-piersi-kobiet/>.
3. Jensen A, Sharif H, Olsen JH i wsp. Risk of breast cancer and gynecologic cancers in a large population of nearly 50, 000 infertile Danish women. *Am J Epidemiol* 2008; 168: 49–57.
4. Boyd NF, Melnichouk O, Martin LJ i wsp. Mammographic density, response to hormones, and breast cancer risk. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2985–2992.
5. Falasca M. Cancer biomarkers: the future challenge of cancer. *J Mol Biomark Diagn* 2012; S2: e001.
6. Bhatt AN, Mathur R, Farooque A i wsp. Cancer biomarkers – current perspectives. *Indian J Med Res* 2010; 132: 129–149.
7. Song N, Sung H, Choi JY i wsp. Preoperative serum levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and survival of breast cancer among Korean women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012; 21: 1371–1380.
8. Zhou G, Lu M, Chen J i wsp. Identification of miR-199a-5p in serum as noninvasive biomarkers for detecting and monitoring osteosarcoma. *Tumour Biol* 2015; 36: 8845–8852.
9. Cruz I, Ciudad J, Cruz JJ i wsp. Evaluation of multiparameter flow cytometry for the detection of breast cancer tumor cells in blood samples. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 66–74.
10. Mego M, Cierna Z, Janega P i wsp. Relationship between circulating tumor cells and epithelial to mesenchymal transition in early breast cancer. *BMC Cancer* 2015; 15: 533.
11. Chen HW, Huang HC, Lin YS i wsp. Comparison and identification of estrogen-receptor related gene expression profiles in breast cancer of different ethnic origins. *Breast Cancer (Auckl)* 2008; 1: 35–49.
12. Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev* 2007; 21: 1025–1030.
13. Guo L, Zhang Y, Zhang W i wsp. Correlation between estrogen receptor beta expression and the curative effect of endocrine therapy in breast cancer patients. *Exp Ther Med* 2014; 7: 1568–1572.
14. Kastner P, Krust A, Turcotte B i wsp. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 1990; 9: 1603–1614.
15. Varghese C. The significance of and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Diagn Res* 2007; 1: 198–203.
16. Brankovic-Magic M, Jankovic R, Neskovic-Konstantinovic Z i wsp. Progesterone receptor status of breast cancer metastases. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128: 55–60.
17. Davis LM, Harris C, Tang L i wsp. Amplification patterns of three genomic regions predict distant recurrence in breast carcinoma. *J Mol Diagn* 2007; 9: 327–336.
18. Berger MS, Locher GW, Saurer S i wsp. Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res* 1988; 48: 1238–1243.
19. Slamon DJ, Clark GM. Amplification of c-erbB-2 and aggressive human breast tumors? *Science* 1988; 240: 1795–1798.
20. Smith I, Procter M, Gelber RD i wsp. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 369: 29–36.
21. Gabos Z, Sinha R, Hanson J i wsp. Prognostic significance of human epidermal growth factor receptor positivity for the development of brain metastasis after newly diagnosed breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5658–5663.
22. Koo T, Kim IA. Brain metastasis in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: from biology to treatment. *Radiat Oncol J* 2016; 34: 1–9.
23. Duchnowska R, Sperinde J, Czartoryska-Artukowicz B i wsp. Predictive value of quantitative HER2, HER3 and p95HER2 levels in HER2-positive advanced breast cancer patients treated with lapatinib following progression on trastuzumab. *Oncotarget* 2017; 8: 104149–104159.
24. Duchnowska R, Sperinde J, Chenna A i wsp. Quantitative HER2 and p95HER2 levels in primary breast cancers and matched brain metastases. *Neuro Oncol* 2015; 17: 1241–1249.
25. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB i wsp. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747–752.
26. Inic Z, Zegrac M, Inic M i wsp. Difference between luminal A and luminal B subtypes according to Ki-67, tumor size, and progesterone receptor negativity providing prognostic information. *Clin Med Insights Oncol* 2014; 8: 107–111.
27. Curigliano G, Burstein HJ, Winer EP i wsp. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Ann Oncol* 2017; 28: 1700–1712.
28. Niwinska A, Olszewski W, Murawska M i wsp. Triple-negative breast cancer with brain metastases: a comparison between basal-like and non-basal-like biological subtypes. *J Neurooncol* 2011; 105: 547–553.
29. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF i wsp. Adjuvant chemotherapy guided by a 21-gene expression assay in breast cancer. *N Engl J Med* 2018; 379: 111–121.
30. Sparano JA, Gray RJ, Makower i wsp. Prospective validation of a 21-gene expression assay in breast cancer. *N Engl J Med* 2015; 373: 2005–2014.
31. Sanft T, Aktas B, Schroeder B i wsp. Prospective assessment of the decision-making impact of the Breast Cancer Index in recommending extended adjuvant endocrine therapy for patients with early-stage ER-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2015; 154: 533–541.
32. Viale G, de Snoo FA, Slaets L i wsp. Immunohistochemical versus molecular (BluePrint and MammaPrint) subtyping of breast carcinoma. Outcome results from the EORTC 10041/BIG 3-04 MINDACT trial. *Breast Cancer Res Treat* 2018; 167: 123–131.
33. Markopoulos C, van de Velde C, Zarca D i wsp. Clinical evidence supporting genomic tests in early breast cancer: Do all genomic tests provide the same information? *Eur J Surg Oncol* 2017; 43: 909–920.
34. Xin L, Liu YH, Martin TA i wsp. The era of multigene panels comes? The clinical utility of Oncotype DX and MammaPrint. *World J Oncol* 2017; 8: 34–40.
35. Martin M, Brase JC, Ruiz A i wsp. Prognostic ability of EndoPredict compared to research-based versions of the PAM50 risk of recurrence (ROR) scores in node-positive, estrogen receptor-positive, and HER2-negative breast cancer. A GEICAM/9906 sub-study. *Breast Cancer Res Treat* 2016; 156: 81–89.
36. Nielsen TO, Parker JS, Leung S i wsp. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 5222–5532.
37. Martin M, Prat A, Rodriguez-Lescure A i wsp. PAM50 proliferation score as a predictor of weekly paclitaxel benefit in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 138: 457–466.

38. Malone KE, Daling JR, Doody DR i wsp. Prevalence and predictors of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based study of breast cancer in white and black American women ages 35 to 64 years. *Cancer Res* 2006; 66: 8297–8308.
39. John EM, Miron A, Gong G i wsp. Prevalence of pathogenic BRCA1 mutation carriers in 5 US racial/ethnic groups. *JAMA* 2007; 298: 2869–2876.
40. Tutt A, Tovey H, Cheang MCU i wsp. Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: the TNT Trial. *Nat Med* 2018; 24: 628–637.
41. Apostolou P, Fostira F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 747318.
42. Keam B, Im SA, Lee K i wsp. Ki-67 can be used for further classification of triple negative breast cancer into two subtypes with different response and prognosis. *Breast Cancer Res* 2011; 13: R22.
43. Kim ST, Jeong H, Woo OH i wsp. Tumor-infiltrating lymphocytes, tumor characteristics, and recurrence in patients with early breast cancer. *Am J Clin Oncol* 2013; 36: 224–231.
44. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstadter F i wsp. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 139: 539–552.
45. Molina R, Auge JM, Farrus B i wsp. Prospective evaluation of carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 15.3 (CA 15.3) in patients with primary locoregional breast cancer. *Clin Chem* 2010; 56: 1148–1157.
46. Kruit A, Gerritsen WB, Pot N i wsp. CA 15-3 as an alternative marker for KL-6 in fibrotic lung diseases. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2010; 27: 138–146.
47. Sobczyk A, Deptała A. Markery nowotworowe w praktyce klinicznej. *Choroby Serca i Naczyni* 2007; 4: 184–189.
48. Giovannella L, Ceriani L, Giardina G i wsp. Serum cytokeratin fragment 21.1 (CYFRA 21.1) as tumour marker for breast cancer: comparison with carbohydrate antigen 15.3 (CA 15.3) and carcinoembryonic antigen (CEA). *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 298–303.
49. Stoetzer OJ, Fersching DM, Salt C i wsp. Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients by circulating apoptotic biomarkers nucleosomes, DNase, cytokeratin-18 fragments and survivin. *Cancer Lett* 2013; 336: 140–148.
50. Ahn SK, Moon HG, Ko E i wsp. Preoperative serum tissue polypeptide-specific antigen is a valuable prognostic marker in breast cancer. *Int J Cancer* 2013; 132: 875–881.
51. Barak V, Goike H, Panaretakis KW i wsp. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin Biochem* 2004; 37: 529–540.
52. Pietrowska M, Marczak L, Polanska J i wsp. Mass spectrometry-based serum proteome pattern analysis in molecular diagnostics of early stage breast cancer. *J Transl Med* 2009; 7: 60.
53. Hadi NI, Jamal Q. "OMIC" tumor markers for breast cancer: A review. *Pak J Med Sci* 2015; 31: 1256–1262.
54. Swellam M, Soliman HA, Abdelmaksoud MD i wsp. Clinical implications of proteolytic activity imbalance in breast cancer diagnosis. *Cancer Biomark* 2014; 14: 409–417.
55. Zhao H, Ho PC, Lo YH i wsp. Interaction of proliferation cell nuclear antigen (PCNA) with c-Abl in cell proliferation and response to DNA damages in breast cancer. *PLoS One* 2012; 7: e29416.
56. Zhao H, Lo YH, Ma L i wsp. Targeting tyrosine phosphorylation of PCNA inhibits prostate cancer growth. *Mol Cancer Ther* 2011; 10: 29–36.
57. Fang WB, Jökar I, Zou A i wsp. CCL2/CCR2 chemokine signaling coordinates survival and motility of breast cancer cells through Smad3 protein- and p42/44 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent mechanisms. *J Biol Chem* 2012; 287: 36593–36608.
58. Li M, Knight DA, Snyder L i wsp. A role for CCL2 in both tumor progression and immunosurveillance. *Oncoimmunology* 2013; 2: e25474.
59. Velasco-Velazquez M, Pestell RG. The CCL5/CCR5 axis promotes metastasis in basal breast cancer. *Oncoimmunology* 2013; 2: e23660.
60. Svensson S, Abrahamsson A, Rodriguez GV i wsp. CCL2 and CCL5 are novel therapeutic targets for estrogen-dependent breast cancer. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 3794–3805.
61. Yu S, Wang X, Liu G i wsp. High level of CXCR4 in triple-negative breast cancer specimens associated with a poor clinical outcome. *Acta Med Okayama* 2013; 67: 369–375.
62. Aoki MN, Amarante MK, Oda JM i wsp. Caveolin involvement and modulation in breast cancer. *Mini Rev Med Chem* 2011; 11: 1143–1152.
63. Pucci M, Bravata V, Forte GI i wsp. Caveolin-1, breast cancer and ionizing radiation. *Cancer Genomics Proteomics* 2015; 12: 143–152.
64. Molina A, Velot L, Ghoinem L i wsp. ATIP3, a novel prognostic marker of breast cancer patient survival, limits cancer cell migration and slows metastatic progression by regulating microtubule dynamics. *Cancer Res* 2013; 73: 2905–2915.
65. Rodrigues-Ferreira S, Di Tommaso A, Dimitrov A i wsp. 8p22 MTUS1 gene product ATIP3 is a novel anti-mitotic protein underexpressed in invasive breast carcinoma of poor prognosis. *PLoS One* 2009; 4: e7239.
66. Takagi K, Mariguchi T, Miki Y i wsp. GATA4 immunolocalization in breast carcinoma as a potent prognostic predictor. *Cancer Sci* 2014; 105: 600–607.
67. Wang HX, Qin C, Han FY i wsp. HIF-2alpha as a prognostic marker for breast cancer progression and patient survival. *Genet Mol Res* 2014; 13: 2817–2826.
68. de Kruijf EM, Dekker TJ, Hawinkels LJ i wsp. The prognostic role of TGF-beta signaling pathway in breast cancer patients. *Ann Oncol* 2013; 24: 384–390.
69. Pietrowska M, Marczak L, Polanska J i wsp. Optimizing of MALDI-ToF-based low-molecular-weight serum proteome pattern analysis in detection of breast cancer patients; the effect of albumin removal on classification performance. *Neoplasma* 2010; 57: 537–544.
70. Chung L, Moore K, Philips L i wsp. Novel serum protein biomarker panel revealed by mass spectrometry and its prognostic value in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2014; 16: R63.
71. Hansen MT, Forst B, Cremers N i wsp. A link between inflammation and metastasis: serum amyloid A1 and A3 induce metastasis, and are targets of metastasis-inducing S100A4. *Oncogene* 2015; 34: 424–435.
72. Bettum IJ, Vasiliauskaite K, Nygaard V i wsp. Metastasis-associated protein S100A4 induces a network of inflammatory cytokines that activate stromal cells to acquire pro-tumorigenic properties. *Cancer Lett* 2014; 344: 28–39.
73. Tamamoto T, Ohno K, Goto-Koshino Y i wsp. Serum amyloid A promotes invasion of feline mammary carcinoma cells. *J Vet Med Sci* 2014; 76: 1183–1188.
74. Kolecka TA, Bender CM, Sereika SM i wsp. Apolipoprotein E genotype and cognitive function in postmenopausal women with early-stage breast cancer. *Oncol Nurs Forum* 2014; 41: E313–325.
75. Uen YH, Liao CC, Lin JC i wsp. Analysis of differentially expressed novel post-translational modifications of plasma apolipoprotein E in Taiwanese females with breast cancer. *J Proteomics* 2015; 126: 252–262.
76. Bouchal P, Dvorakova M, Roumeliotis T i wsp. Combined proteomics and transcriptomics identifies carboxypeptidase B1 and nuclear factor

- kappaB (NF-kappaB) associated proteins as putative biomarkers of metastasis in low grade breast cancer. *Mol Cell Proteomics* 2015; 14: 1814–1830.
77. Johansson HJ, Sanchez BC, Forshed J i wsp. Proteomics profiling identify CAPS as a potential predictive marker of tamoxifen resistance in estrogen receptor positive breast cancer. *Clin Proteomics* 2015; 12: 8.
78. Beretov J, Wasigner VC, Millar EK i wsp. Proteomic analysis of urine to identify breast cancer biomarker candidates using a label-free LC-MS/MS approach. *PLoS One* 2015; 10: e0141876.
79. Cheng F, Wang Z, Huang Y i wsp. Investigation of salivary free amino acid profile for early diagnosis of breast cancer with ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2015; 447: 23–31.
80. Lee HB, Kang UB, Moon HG i wsp. Development and validation of a novel plasma protein signature for breast cancer diagnosis by using multiple reaction monitoring-based mass spectrometry. *Anticancer Res* 2015; 35: 6271–6279.
81. Cine N, Baykal AT, Sunnetci D i wsp. Identification of ApoA1, HPX and POTE genes by omic analysis in breast cancer. *Oncol Rep* 2014; 32: 1078–1086.
82. Washam CL, Byrum SD, Leitzel K i wsp. Identification of PTHrP(12-48) as a plasma biomarker associated with breast cancer bone metastasis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013; 22: 972–983.
83. Zhang G, Sun X, Lv H i wsp. Serum amyloid A: a new potential serum marker correlated with the stage of breast cancer. *Oncol Lett* 2012; 3: 940–944.
84. Lianidou ES, Markou A, Strati A. The role of CTCs as tumor biomarkers. *Adv Exp Med Biol* 2015; 867: 341–367.
85. Maltoni R, Fici P, Amadori D i wsp. Circulating tumor cells in early breast cancer: A connection with vascular invasion. *Cancer Lett* 2015; 367: 43–48.
86. Wang H, Molina J, Jiang J i wsp. Gene expression markers in circulating tumor cells may predict bone metastasis and response to hormonal treatment in breast cancer. *Mol Clin Oncol* 2013; 1: 1031–1038.
87. Pukazhendhi G, Gluck S. Circulating tumor cells in breast cancer. *J Carcinog* 2014; 13: 8.
88. Green TM, Alpaugh ML, Barsky SH i wsp. Breast cancer-derived extracellular vesicles: characterization and contribution to the metastatic phenotype. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 634865.
89. Wu X, Somlo G, Yu P i wsp. De novo sequencing of circulating miRNAs identifies novel markers predicting clinical outcome of locally advanced breast cancer. *J Transl Med* 2012; 10: 42.
90. Wang, B, Wang H, Yang Z. MiR-122 inhibits cell proliferation and tumorigenesis of breast cancer by targeting IGF1R. *PLoS One* 2012; 7: e47053.
91. Liu Y, Cai Q, Bao PP i wsp. Tumor tissue microRNA expression in association with triple-negative breast cancer outcomes. *Breast Cancer Res Treat* 2015; 152: 183–191.
92. Huang Q, Gumireddy K, Schrier H i wsp. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 202–210.
93. Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ i wsp. MicroRNAs as novel biomarkers for breast cancer. *J Oncol* 2009; 2009: 950201.
94. Schrauder MG, Strick R, Schulz-Wendtland R i wsp. Circulating micro-RNAs as potential blood-based markers for early stage breast cancer detection. *PLoS One* 2012; 7: e29770.